

Diagnostyka serologiczna enzootycznej białaczki bydła antygenem BOVINCR

EWA BUZAŁA, JAN RUŁKA, WITOLD DEREŃ*

Pracownia Patologii Komórkowej Państwowego Instytutu Weterynarii, Al. Partyzanów 57, 24-100 Puławy
*Państwowa Inspekcja Weterynaryjna, ul. Gdańska 3, 49-100 Głubczyce

Buzała E., Rułka J., Dereń W.

Serological diagnosis of bovine leukosis with BOVINCR antigen

Summary

The aim of the investigation was to evaluate the specific nature and sensitivity of the Polish variant of BLV antigen in routine serological diagnoses of bovine leukosis. The experimental BOVINCR antigen prepared from NCR-II cells culture and the reference antigen prepared from FLK cells (American variant) were used for the purpose of the investigation. A total of 1031 samples of sera from 4 - 8 year-old cattle infected with bovine leukemia virus were studied. The positive results of the immuno-diffusion test for BOVINCR antigen was demonstrated in 292 (78.7%) sera from farm A, 87 (41.4%) sera from farm P and 16 (3.5%) from farm G. The results for the reference antigen were similar – 290 (78.2%), 86 (40.9) and 16 (3.5%), respectively. The positive serum with specific BLV antibodies gave clearly marked precipitation bands for the gp51 and p24 proteins of both these antigens. In effect, the examined antigen proved to be very useful for routine diagnosis of bovine leukosis in Poland in the immuno-diffusion test.

Keywords: bovine leukosis, diagnosis, BOVINCR antigen.

Diagnostyka serologiczna enzootycznej białaczki bydła jest nadal aktualnym problemem w zwalczaniu tej choroby. Powszechnie stosowanym testem diagnostycznym jest odczyn immunodyfuzji – ID i test ELISA (1-9). Badania te umożliwiają eliminację zwierząt zakażonych ze stad zapowietrzonych oraz ochronę stad wolnych od wprowadzenia sztuk zakażonych BLV (Bovine Leukemia Virus). W zależności od rejonu kraju, wielkości i struktury stada, białaczka enzootyczna nadal stanowi poważne zagrożenie w hodowli bydła w Polsce (1, 2, 5, 7, 9-14). Wysoki procent zakażeń notuje się w południowo-zachodnim rejonie kraju. W województwie wrocławskim zbadano testem ID 4499 krów w 36 oborach, wykazując w poszczególnych stadach od 12% do 82% zakażeń wirusem BLV (12). W oborach o zamkniętym cyklu produkcji stopień zakażeń bydła wahał się od 37% do 64%. Deptuła i wsp. (1) wykazali 11,9% do 39,0% dodatnich wyników testu ID wśród 730 sztuk bydła badanego w 1984 r. i 10,8% do 23,7% wśród 515 sztuk w 1985 r. Rułka i wsp. (15) donoszą, że spośród 2053 sztuk bydła dodatni wynik badania serologicznego testem ELISA stwierdzono w 804 przypadkach (39%), przy czym wraz z wiekiem wzrasta liczba zwierząt reagujących dodatnio. W grupie bydła w wieku powyżej 6 miesięcy

cy do 2 lat stwierdzono 355 (42,8%) sztuk wykazujących dodatni wynik badania serologicznego, w grupie bydła wysoko-produkcyjnego w wieku od 3 do 7 lat – 449 sztuk (46%), zaś w grupie zwierząt najstarszych od 8 do 12 lat – 157 (63,5%) sztuk.

Celem badań była ocena wartości diagnostycznej – swoistości i czułości polskiego wariantu antygeny BOVINCR, uzyskanego z komórek NCR-II/BLV, w rutynowej kontroli serologicznej białaczki bydła, w warunkach wybranego laboratorium terenowego.

Materiał i metody

Antygen doświadczalny – seria A1098. Antygen ten stanowił zagęszczony supernatant z hodowli komórek NCR-II/BLV. Celem przygotowania puli antygeny zbierano najpierw odpowiednią ilość supernatantu, dodawano siarczan amonu $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$ w ilości 30 g/100 ml i wstawiano do temp. 4°C na 72 godz. Po tym czasie mieszaninę wirowano 40 min. 2500 obr./min., osad rozpuszczano w H_2O red. w 1/10 objętości wyjściowej, pozostawiając na noc w temp. 4°C i ponownie wirowano 30 min. 2500 obr./min. Tak uzyskany antygen oczyszczano na kolumnie chromatograficznej z Sephadexem G-25, po czym liofilizowano i rozpuszczano w H_2O red. do 1/100 wyjściowej objętości zebranego supernatantu. Zagęszczony antygen poddawano kontro-

Tab. 1. Wyniki ID surowic bydła z gospodarstw zapowietrzonych BLV przy użyciu dwu różnych antygenów

Gospodarstwo	Liczba badanych krów	Wyniki odczynu immunodyfuzji (ID)					
		Antygen referencyjny s.A1009			Antygen doświadczalny – BOVINCR s.A1098		
		+	(%)	-	+	(%)	-
A	371	290	78,2	81	292	78,7	79
P	210	86	40,9	124	87	41,4	123
G	450	16	3,5	434	16	3,5	434
Ogółem	1031	392		639	395		636

li swoistości z referencyjnymi surowicami anty-BLV w odczynie immunodyfuzji, a wynik dodatni był podstawą uznania go za gotowy preparat w rutynowej diagnostyce enzootycznej białaczki bydła odczynem ID. Otrzymany preparat (seria A1098) nazwano polskim wariantem antygeny wirusa BLV – BOVINCR.

Antygen referencyjny seria A1009. Antygen ten stanowił zagęszczony supernatant z hodowli komórek FLK/BLV (wariant amerykański). Przygotowano go według wyżej podanej metodyki.

Surowice. Ogółem w badaniach terenowych użyto 1031 surowic bydła pochodzącego z 3 gospodarstw, zapowietrzonych wirusem BLV.

Odczyn immunodyfuzji (ID). Test wykonywano zgodnie z obowiązującą w Polsce instrukcją (4).

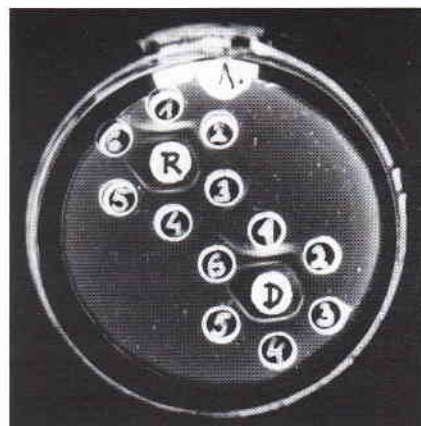
Test ELISA. Badanie wykonywano zestawem SERELIF-FA BLV Ab Mono Blocing firmy Rhône Mérieux.

Wyniki i omówienie

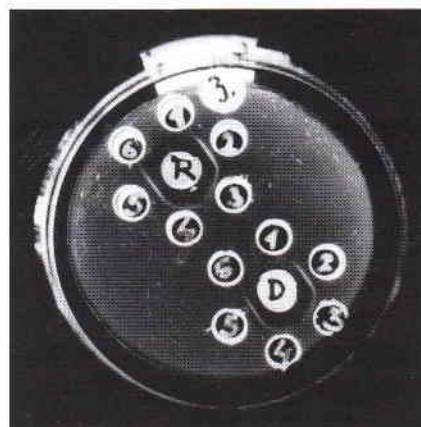
Uzyskane rezultaty przedstawia tab. 1 oraz ryc. 1 i 2.

Ogółem przebadano 1031 surowic bydła mlecznego w wieku 4-8 lat, pochodzących z trzech gospodarstw: A, P i G. Dodatni wynik odczynu immunodyfuzji z antygenem referencyjnym w gospodarstwie A wykazano dla 290 surowic (78,2%), w gospodarstwie P – dla 86 surowic (40,9%), zaś w gospodarstwie G tylko dla 16 surowic (3,5%). Kontrola serologiczna surowic z antygenem doświadczalnym – BOVINCR wykazała 292 (78,7%) wyniki dodatnie w gospodarstwie A, 87 (41,4%) w gospodarstwie P, a w gospodarstwie G – tylko w przypadku 16 surowic (3,5%), podobnie jak z antygenem referencyjnym. Ogółem w badaniach tych uzyskano 392 wyniki dodatnie z antygenem referencyjnym z komórek FLK i 395 z antygenem doświadczalnym z komórek NCR-II/BLV.

Wyniki kontroli swoistości odczynu immunodyfuzji z antygenem referencyjnym i antygenem doświadczalnym przedstawia ryc. 1 i 2. Rezultaty odczynu ID dla surowic referencyjnych prezentuje ryc. 1, zaś dla surowic terenowych – ryc. 2. Górna rozeta płytki przedstawia wyniki dla antygeny referencyjnego, zaś dolna – dla antygeny doświadczalnego BOVINCR. W przypadku wzorcowej surowicy K2, zawierającej swoiste przeciwciała dla wirusowych białek gp51 i p24, stwier-



Ryc. 1. Wyniki odczynu immunodyfuzji (ID) surowic referencyjnych z antygenami: R – referencyjnym (s.A1009) i D – antygenem BOVINCR (s.A1098); surowice bydłecze: 1 – K₂, 2 – Czajka, 3 – Hanna, 5 – Biedronka, 6 – surowica ujemna, 4 – surowica owcza (051)



Ryc. 2. Wyniki odczynu immunodyfuzji (ID) surowic terenowych z antygenami: R – referencyjnym (s.A1009) i D – antygenem BOVINCR (s.A1098); 1 – surowica 703, 2 – 648, 3 – 647, 4 – 646, 5 – 697, 6 – 676

dzono dwa typowe prążki precypitacyjne dla obu użytych antygenów. Dodatni wynik odczynu stwierdzono zarówno w przypadku referencyjnych surowic bydłeczych – K₂, Czajka, Hanna, Biedronka, jak i wzorcowej surowicy owczej – 051. Typowy prążek precypitacyjny dla surowicy owczej i surowic bydłeczych, potwierdza obecność w nich swoistych przeciwciał od-

pornościowych anti-gp51 wirusa białaczki bydła. Należy dodać, że wymienione prążki dla antygeny BOVINCR były wyraźniejsze i mocniej zaznaczone. Surowica wolna od przeciwciał anti-BLV, wykazywała ujemny wynik odczynu ID. Podobne rezultaty uzyskano z surowicami terenowymi – ryc. 2. W efekcie otrzymano wprawdzie różną ostrość prążków precypitacyjnych dla czterech surowic dodatnich, jednakże ogólny wynik odczynu ID był identyczny dla obu antygenów. Należy zaznaczyć, że spośród 6 użytych surowic terenowych dwie z nich były ujemne, a cztery wykazywały dodatni wynik immunodufuzji potwierdzony testem ELISA (procent zahamowania wynosił od 31,0 do 96,9).

Przedstawione wyniki wskazują, że polski wariant antygeny BOVINCR, użyty w odczynie immunodufuzji w żelu agarozowym, zawiera dwa podstawowe białka wirusa BLV (gp51 i p24) niezbędne w serologicznej diagnostyce enzootycznej białaczki bydła. Uzyskane prążki precypitacyjne są wyraźnie widoczne i w sposób ciągły przechodzą pomiędzy basenikiem antygeny a basenikami surowic referencyjnych łącząc się bez krzyżowania w jedną wspólną linię. W przypadku surowicy K2 obecność prążka precypitacyjnego bliżej basenika z antygenem świadczy o przeciwciałach dla glikoproteiny gp51 wirusa białaczki, zaś prążek ułożony bliżej basenika z surowicą – o przeciwciałach dla polipeptydu p24. Prążek precypitacyjny obserwowany w przypadku bydłych surowic referencyjnych, jak i surowicy owczej – 051, wskazuje na obecność w nich swoistych przeciwciał dla otoczkowej glikoproteiny gp51 wirusa BLV. Obecność jednego lub dwu prążków precypitacyjnych świadczy bezpośrednio o dodatnim wyniku odczynu immunodufuzji surowicy badanej. Przy niskim mianie przeciwciał, prążek precypitacyjny jest niepełny i zaznacza się tylko jego część w sąsiedztwie surowicy badanej (ryc. 2). Badania przeprowadzone na 1031 surowicach bydła dorosłego wykazały, że uzyskane prążki precypitacyjne były wyraźnie widoczne i nie notowano zmeńnień wokół basenika z surowicą.

Reasumując należy stwierdzić, że antygen doświadczalny BOVINCR, uzyskany z polskiego wariantu wirusa BLV namnożonego w hodowli komórek linii ciągłej NCR-II, wykazuje pełne walory diagnostyczne w rutynowej kontroli serologicznej enzootycznej białaczki bydła. Stopień wykrywalności swoistych przeciwciał anti-BLV w surowicy krwi bydła zakażonego BLV przy użyciu tego antygeny jest identyczny, a w pojedynczych przypadkach wyższy niż przy użyciu antygeny referencyjnego, uzyskanego z komórek FLK (wariant amerykański). Ogółem w gospodarstwie A uzyskano 78,2% dodatnich wyników dla antygeny referencyjnego i 78,7% dla antygeny BOVINCR, zaś w gospodarstwie P – odpowiednio: 40,9% i 41,4%. W gospodarstwie G notowano pełną zgodność uzyskanych wyników odczynu ID. Na uwagę zasługuje zgodność wszystkich dodatnich rezultatów dla obu antygenów oraz 3 dodatnie wyniki tylko dla antygeny BO-

VINCR, potwierdzone dodatnim wynikiem testu ELISA. Cecha ta jest szczególnie istotna gdyż uwzględnia ona przede wszystkim krajowe warunki kontroli zakażeń bydła wirusem BLV. Nie można wykluczyć, że dodatkowe pojedyncze dodatnie wyniki odczynu ID z antygenem BOVINCR, są związane z odmiennością struktury aminokwasów glikoproteiny gp51, kodowanej przez zmieniony DNA genu env prowirusa BLV zakażonych zwierząt. Być może podjęte w tym kierunku badania pozwolą na wyjaśnienie istniejących różnic w kontroli serologicznej przy pomocy obu wymienionych antygenów.

Piśmiennictwo

1. Deptula W., Rulka J., Deptula D.: Mat. VIII KONGRESU PTNW, Warszawa 2, 106, 1987.
2. Ganowicz M.: Mat. VIII KONGRESU PTNW, Warszawa 2, 172, 1987.
3. Grundboeck M., Grundboeck-Juško J.: Medycyna Wet. 38, 19, 1988.
4. Grundboeck M., Grundboeck-Juško J.: Instrukcja serologicznego rozpoznawania enzootycznej białaczki bydła przy użyciu testu immunodufuzji w żelu (ID), Nr 54, Min. Rol. i Gospod. Żywn. Dep. Wet. z dnia 20 lutego 1983.
5. Kita J., Dobrowolski W., Kowalski B., Kruszewski A.: Mat. VII Kongresu PTNW, Lublin 1, 20, 1983.
6. Kita J., Kowalski B., Bieńkowski J.: Medycyna Wet. 43, 12, 1987.
7. Klimentowski S.: Medycyna Wet. 42, 342, 1986.
8. Klimentowski S.: Medycyna Wet. 44, 149, 1988.
9. Kołacz J.: Życie wet. 76, 97, 1992.
10. Kuźmak J., Grundboeck-Juško J.: Medycyna Wet. 42, 217, 1986.
11. Łosieczka K.: Medycyna Wet. 42, 595, 1986.
12. Łosieczka K., Klimentowski S.: Medycyna Wet. 44, 270, 1988.
13. Łosieczka K., Klimentowski S.: Medycyna Wet. 44, 328, 1988.
14. Łosieczka K., Klimentowski S.: Medycyna Wet. 48, 205, 1992.
15. Rulka J., Klimentowski S., Szczotka M., Stec J.: Medycyna Wet. 50, 265, 1994.
16. Stec J., Grundboeck-Juško J., Grundboeck M.: Medycyna Wet. 41, 117, 1985.

Adres autora: inż. Ewa Buzala, 24-122 Jaroszyn 57

TRYLAND M., KLEIVANE L., ALFREDSSON A., KJELD M., ARNASON A., STUEN S., GODFROID J.: Infekcja *Brucella* u ssaków morskich w części Północnej Oceanu Atlantyckiego. (Evidence of *Brucella* infection in marine mammals in the North Atlantic Ocean). Vet. Rec. 144, 588-592, 1999 (21)

Nie jest dokładnie znana rola dzikich gatunków zwierząt jako rezerwuaru *Brucella*. Stąd też w okresie 1987-1996 przebadano testem ELISA 1386 surowic pochodzących od 4 gatunków fok i 3 gatunków wielorybów żyjących w części północnej Oceanu Atlantyckiego. Surowice reagujące pozytywnie w odczynie ELISA przebadano następnie w odczynie aglutynacji, odczynie aglutynacji zmodyfikowanym EDTA, testem z czerwieni bengalską, odczynie wiązania dopełniacza i w teście anti-complement-ELISA. Przeciwciała dla *Brucella* występowały u 7 z 8 badanych gatunków zwierząt, brak ich było jedynie u *Erigratus barbatus*. Częstotliwość wyników pozytywnych (%) wynosiła u *Cystophora cristata* 35, *Phoca groenlandica* 2, *Ph. hispida* 10, *Balaenoptera acutorostrata* 8, *B. physalus* 11 i *B. borcalus* 14. *Brucella* wyosobniono z wątroby i śledziony *B. acutorostrata*.